

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**



LID

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

② N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 701 715

③ N° d'enregistrement national :

93 01776

⑤ Int Cl<sup>3</sup> : C 12 N 1/20

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 17.02.93.

③③ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 26.08.94 Bulletin 94/34.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
présent fascicule.

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA  
RECHERCHE AGRONOMIQUE — FR.

⑦② Inventeur(s) : Gruss Alexandra.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schimpf  
Warcoin Ahner.

⑤④ Procédé de décontamination d'un milieu de fermentation et produit permettant sa mise en œuvre.

⑤⑦ L'invention concerne un procédé de décontamination  
d'un milieu de fermentation caractérisé en ce que, avant,  
ou pendant, l'introduction de l'inoculum de fermentation, le  
milieu est mis en contact intime avec des éléments solides  
comportant les récepteurs normalement présents sur les  
enveloppes des bactéries de l'inoculum, pendant un temps  
suffisant pour assurer la fixation des contaminants, en par-  
ticulier des phages.

Elle concerne également un produit permettant la mise  
en œuvre de ce procédé.

Metode til at "dekontaminere"  
et fermenteringsmediet,  
karakteriseret ved at tilsette  
døde bakterier hvorpå  
bakteriophage sætter sig og  
dermed dør, således at  
de levende bakterier der  
skal bruges til fermentering  
ikke angribes

:R 2 701 715 - A1

2701715

I

La présente invention concerne un procédé permettant de lutter contre les contaminations intervenant au cours des processus de fermentation ainsi qu'un produit permettant la mise en oeuvre de ce procédé.

5 Un grand nombre d'industries ont recours à la culture en grand volume de bactéries ou de levures pour l'obtention de produits d'intérêt. Parmi les industries faisant appel aux processus de fermentation, on peut citer l'industrie de production des antibiotiques et l'industrie agroalimentaire notamment pour la fabrication de produits laitiers fermentés.

10 L'un des problèmes majeurs qui peuvent se poser est la contamination des cultures par des virus qui attaquent et détruisent les cellules bactériennes. Ces virus s'appellent des bactériophages (phage) s'ils ont pour hôtes des bactéries. Par exemple, dans le cas des fermentations du lait, les bactériophages sont spécifiques des bactéries lactiques du ferment.

15 En général, un phage donné ne peut infecter qu'une espèce particulière, ou une souche, ou des souches étroitement apparentées, d'une bactérie. La plupart des bactéries sont susceptibles d'être infectées par des phages, et une souche donnée de bactérie peut être sensible à différents phages.

20 Le phage, après adsorption sur la bactérie, y injecte son matériel génétique (ADN ou ARN). Après un cycle de multiplication, les phages vont provoquer la lyse de la cellule bactérienne et se propager aux cellules voisines. Le résultat est une croissance faible de la culture des bactéries, par lyse du ferment, et perte du produit désiré ; cette  
25 contamination peut donner un produit inférieur, ou peut rendre inutilisable la totalité de la fermentation, obligeant à son élimination, ce qui dans les deux cas, peut amener à un surcoût économique considérable. Ces pertes économiques représentent un pourcentage important du chiffre d'affaire dans l'industrie laitière, où les qualités organoleptiques et hygiéniques du  
30 produit fini dépendent étroitement de la cinétique d'acidification du lait amené par le développement des bactéries et donc du développement des bactéries lactiques.

2701715

2

Les phages proviennent de l'environnement, mais aussi, un grand nombre de bactéries porte des phages silencieux ou lysogénisés, qui deviennent virulents sous conditions de stress. Des signaux subtils peuvent déclencher un cycle lytique des phages dans une souspopulation de bactéries, qui peuvent infecter les cellules voisines.

Un certain nombre d'agents sont actifs sur les bactériophages, par exemple les phénols, les oxydants, certains métaux lourds, mais soit ils ne sont pas utilisables dans des produits destinés à la consommation humaine, soit ils ne sont pas suffisamment efficaces.

Des tentatives pour réduire et contrôler le développement des phages par différents traitements physiques du ferment n'ont jusqu'à présent donné que des résultats très insatisfaisants. La stratégie actuelle, partiellement efficace est d'alterner différents mélanges de souches quand il y a un problème. Parfois, une croissance ralentie peut être due à une infection phagique se développant à bas niveau. Les approches biologiques sont également limitées par le manque d'informations génétiques sur la nature des bactéries du ferment; seul un petit nombre de mécanismes de résistance aux phages a été élucidé. Ces systèmes de résistance sont ciblés à des souches bactériennes et à des phages très spécifiques, et comprennent l'utilisation de souches bien définies et/ou recombinantes dans la fermentation, qui est encore loin d'être réalisable pour l'obtention d'un produit laitier par exemple. De plus, les phages peuvent "échapper" à ces systèmes lorsqu'ils acquièrent des mutations qui les rendent résistants.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé de décontamination d'un milieu de fermentation par l'emploi d'un piège comprenant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries de l'inoculum de fermentation. Par enveloppes on entend, selon le type de bactéries, les parois et/ou les membranes des bactéries. Les bactéries mortes, ou une préparation d'enveloppes bactériennes, contiennent les récepteurs identiques aux bactéries vivantes qui piègent les phages. Avant l'introduction de l'inoculum de fermentation contenant les bactéries vivantes, ou simultanément à cette introduction le milieu où aura lieu la

2701715

3

fermentation est mis en contact intime avec des éléments solides comportant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries de l'inoculum, pendant un temps suffisant pour assurer la fixation des contaminants, en particulier des phages. Cette stratégie ne  
5 dépend pas du type de levain utilisé, car le procédé utilise des cellules mortes identiques au levain. Les cellules mortes peuvent rester dans le milieu comme une partie du levain, i.e., pendant la fermentation pour adsorber les phages libérés par les bactéries du levain en train de croître.

Par milieu, on entend le milieu nutritif liquide dans lequel  
10 aura lieu la fermentation.

Le procédé peut être appliqué lors de la préparation du ferment ; pour cela, le piège comprenant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries est ajouté au milieu de croissance des bactéries qui vont servir à ensemercer le milieu de fermentation.

15 Mais l'invention comprend également le traitement de la cuve de fermentation, après un cycle de fermentation, par les bactéries de l'inoculum, mortes, afin d'éliminer, de façon optimale, les contaminants résiduels. Pour cela, après élimination du milieu dans lequel a eu lieu la fermentation précédente, on introduit dans la cuve de fermentation un  
20 milieu contenant les bactéries mortes, de manière à assurer un contact intime avec l'ensemble des éléments du conteneur. Après un temps de séjour suffisant pour assurer la fixation des contaminants, notamment phagiques, présents dans la cuve, on élimine le milieu contenant les bactéries mortes qui ont adsorbé les contaminants. Dans la cuve ainsi  
25 décontaminée, on peut alors procéder à un nouveau cycle de fermentation après introduction d'un milieu de fermentation frais. Ce milieu de fermentation pourra lui-même être traité par un piège préparé à partir des bactéries du ferment, mortes, selon le procédé de l'invention, avant l'addition des bactéries vivantes du ferment.

30 Les cellules mortes servent à deux choses, à éliminer les contaminants phagiques, et à permettre la croissance de cellules vivantes. Différentes manières de préparer les bactéries mortes en vue du piège selon l'invention peuvent être envisagées :

2701715

4

- par rayonnement ultraviolet, chauffage, ou autre traitement,
- par une préparation de cellules cassées (désintégrées), par traitement mécanique,
- 5 - par une préparation de cellules cassées (désintégrées), par traitement mécanique par exemple par presse de French, désintégrateur de cellule ou sonicateur de cellule dont les enveloppes bactériennes (récepteurs) seulement peuvent être récupérées, après séparation, par exemple par centrifugation.

10 Selon l'un des aspects de l'invention, les bactéries mortes, ou les éléments solides comportant les récepteurs d'enveloppes qui sont mis en contact intime avec le milieu de fermentation, sont immobilisés sur un support. Ce support, solide, peut notamment être constitué d'une membrane ou être un support particulaire ou toute autre matrice sur lesquels les cellules mortes peuvent s'adsorber.

15 L'invention a donc également pour objet un produit permettant la mise en oeuvre du procédé caractérisé en ce qu'il comporte un support sur lequel sont adsorbés des éléments solides comportant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries participant à la fermentation.

20 Pour l'utilisation, le produit est immergé dans le milieu de fermentation. Les bactériophages reconnaissent les récepteurs phagiques des bactéries mortes et s'adsorbent. Cependant, les phages ne peuvent pas se multiplier dans les bactéries mortes. Ils s'attachent aux récepteurs de l'enveloppe bactérienne et se trouvent ainsi piégés. Lors de l'addition 25 ultérieure de l'inoculum de fermentation, le nombre de phages est réduit et le développement d'infection est évité. Les bactéries poussent alors normalement.

30 Dans l'une des variantes du procédé selon l'invention, les bactéries mortes sont immobilisées sur une membrane à travers laquelle on fait passer le milieu de fermentation à décontaminer, et après la matrice (membrane) est retirée.

De manière préférée, les bactéries mortes, immobilisées ou non sur un support, sont mises en suspension dans le milieu de fermentation, de façon à assurer la meilleure dispersion et la plus grande surface de contact avec le milieu.

Les éléments solides comportant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries de l'inoculum (bactéries mortes ou préparation d'enveloppes) peuvent être écartés avant l'addition de l'inoculum de fermentation. On peut par exemple soumettre le milieu à une  
5 filtration, pour éliminer ces éléments ayant piégé les phages.

Cependant, dans une autre variante du procédé, les bactéries mortes sont maintenues dans le milieu, lors de l'addition du ferment et pendant toute la durée de la fermentation. Ceci est particulièrement avantageux dans le cas de bactéries lysogènes, c'est-à-dire de bactéries du  
10 levain qui portent le bactériophage à l'état masqué ; chez de telles bactéries, la multiplication du phage est réprimé. Le bactériophage peut être réactivé, soit spontanément, soit à la suite d'un choc physique ou chimique, et entamer alors un cycle lytique. Si cette induction survient au moment de l'addition du ferment, la présence des bactéries mortes  
15 permettra de piéger les phages produits et de limiter l'infection.

On sait par exemple que lors de la fabrication de fromage, c'est au cours de la première heure de fermentation que les risques de contamination sont les plus importants ; ensuite, une chute du pH du milieu se produit, ce qui aide à empêcher le développement des phages. La  
20 présence de cellules mortes peut permettre aux cellules vivantes de se multiplier pendant ce temps critique jusqu'à ce que le pH bas soit atteint.

Les cellules traitées aux UV ont toujours une activité enzymatique, c'est-à-dire, elle participent à la fermentation du lait, puis elles meurent. L'utilisation de cellules traitées aux UV qui semblent être  
25 résistantes aux phages peut, dans cette première étape, faire baisser le pH (ou même, les cellules traitées aux UV peuvent elles-mêmes effectuer la fermentation, au moins partiellement) ; dans ce milieu, les cellules vivantes sont moins sensibles aux phages, ou les phages sont partiellement inactivés.

Etant donné que les bactéries mortes sont identiques à celles  
30 du ferment, leur addition ne change pas la composition du ferment. Donc leur utilisation n'entraîne pas l'utilisation de souches distinctes ni de produit potentiellement toxique ou inconnu.



2701715

6

Le maintien des bactéries mortes, dans le milieu de fermentation n'entraîne pas de modifications gênantes, grâce à l'emploi de bactéries identiques à celles du ferment. En outre, les bactéries mortes sont ajoutées à une concentration finale de l'ordre de  $10^6$  à  $10^9$  bactéries mortes/ml de milieu de fermentation. Il s'agit donc de taux relativement faibles par rapport à la quantité de bactéries vivantes présentes à la fin du cycle de fermentation. Ces taux peuvent bien entendu être modifiés par l'homme du métier en fonction des souches et de l'affinité du phage correspondant, ainsi qu'avec les conditions particulières de mise en oeuvre du procédé.

Selon l'un des aspects de l'invention, les bactéries mortes utilisées dans le procédé de décontamination, sont obtenues à partir d'une culture de bactéries du ferment en phase stationnaire, que l'on soumet à un traitement par la chaleur.

Selon un autre aspect de l'invention, les bactéries mortes sont obtenues à partir de culture de bactéries du ferment en phase stationnaire, qui est soumise à un traitement par rayonnement X, gamma, ou ultraviolet.

La durée et l'intensité des traitements pourront être déterminées par l'homme du métier, surtout en fonction de la concentration des cellules.

D'excellents résultats sont obtenus pour le procédé de décontamination selon l'invention, avec l'emploi des bactéries tuées par des rayonnements UV. Ces expériences étaient effectuées en utilisant du lait, ou du milieu du laboratoire. L'une des hypothèses que l'on peut avancer, par laquelle on n'entend nullement limiter l'invention, est que les UV laisseraient subsister chez les bactéries mortes, certains systèmes enzymatiques permettant normalement le renouvellement des récepteurs phagiques. Ces bactéries tuées par UV participent aussi à la fermentation du fromage (décrit ci-dessus).

Le présent procédé de décontamination peut être adapté par l'homme du métier aussi bien dans le cadre d'un procédé de fabrication de produits lactés, notamment de fromages ou de yaourts, ou d'autres produits de fermentation (viande...) menée par des bactéries lactiques, que lors de la

2701715

7

préparation d'autres produits de fermentation alimentaire (salaisons, alcools, etc) ou de tout type de technologie mettant en oeuvre la fermentation.

5 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent. Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1 : Courbes de titrage des phages qui infectent des cultures bactériennes traitées ou non par le procédé selon l'invention.

10 Figure 2 : Electrophorèse du contenu cellulaire de cultures de *L. lactis* 145 vivantes ou tuées par UV et infectées par des phages. Les contenus cellulaires sont préparés avant l'addition de phages, et aux temps 0, 10, 20 et 40 min de la culture.

15 Figure 3 : Fermentation de lait en présence de phages et de *L. lactis* vivantes sans (rangée inférieure) ou avec (rangée supérieure) addition de cellules tuées par UV (Deadpack).

### EXEMPLE 1 : PREPARATION DES BACTERIES MORTES

20 Les souches (correspondant au levain par exemple) sont cultivées en bouillon de culture jusqu'à la phase stationnaire. Les cellules en phase stationnaire sont alors centrifugées et concentrées dix fois en tampon de Ringer. Les cellules remises en suspension sont soumises à un traitement par les UV, à environ  $10^4$  Joules. La concentration élevée de cellules utilisée pour simuler les applications potentielles à grande échelle  
25 du procédé, nécessite un traitement aux UV de longue durée. La survie des cellules après traitement aux UV est d'environ  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$ .

Dans le cas des cellules tuées par la chaleur, les cellules remises en suspension subissent un chauffage à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes ; le taux de survie est inférieur à  $10^{-7}$  (le temps de chauffage peut être  
30 modifié).

Les préparations de bactéries mortes sont conservées à  $4^{\circ}\text{C}$  ou à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du glycérol à 15%. Elles peuvent également être lyophilisées.

2701715

8

Lors de l'utilisation, les cellules bactériennes mortes sont ajoutées au milieu de fermentation de manière à obtenir une concentration finale d'environ  $5.10^8$  cellules par ml.

Dans la suite des exemples, les cellules mortes selon l'invention seront désignées par le terme de Deadpack.

### EXEMPLE 2 : DIMINUTION DU TITRE EN PHAGES PAR DEADPACK

Dans ce test on mesure les effets de l'addition de Deadpack sur le titrage de différents bactériophages ajoutés dans le milieu. Sept types de bactériophages, et 4 souches de bactéries lactiques, présentés dans le tableau 1 sont utilisés. La capacité de cellules mortes par UV à diminuer le titre en phages est testée. Pour chaque paire (souche et phage spécifique de la souche),  $5.10^8$  cellules mortes sont mélangées, dans un milieu de laboratoire (MRS ou M17 contenant du  $Ca^{++}$  0,1M) ou du lait, avec entre  $2.10^6$  et  $10^8$  unités formant plages (ufp) par millilitre (ml). Ces concentrations sont supérieures au titre permettant le développement naturel des phages. Le témoin ne contient pas de cellules mortes.

On incube, selon les cas des cellules mortes préparées par traitement aux UV ou par la chaleur, ou des cellules vivantes, à température ambiante, pendant 20 minutes avec les phages. On mesure le titre résiduel en phage dans le surnageant de culture après centrifugation. Ces résultats sont présentés dans le tableau 1.

On observe une chute de 1 à 3 logs dans le titre des phages pour les sept paires bactéries-phages testées. L'efficacité, respectivement, des cellules vivantes et des cellules mortes sur le titrage des phages dans le surnageant est à peu près la même, ce qui montre que les récepteurs de phages restent intacts. La mesure est effectuée par comptage du nombre de plages formées sur un tapis de bactéries vivantes, sensibles au phage testé, avec une gamme de dilutions du surnageant. On ne peut pas titrer les phages quand un couple hétérologue est utilisé, ce qui indique que le titrage est spécifique. Ces résultats montrent que Deadpack peut être efficace dans beaucoup de cas comme un piège de phages pendant une courte exposition aux phages.

2701715

9

TITRE EN PHAGES<sup>a</sup> [DIMINUTION]

SOUCHE	PHAGE	ADDITIONS DE DEADPACK		
		NON	DEADPACK UV	DEADPACK CHAUFFE 70°C
Lactococcus lactis subsp. lactis IL 1403	41	$3 \times 10^6$	$2 \times 10^4$ [ $10^2$ ] <sup>b</sup>	$10^6$ n.d.
	66	$10^8$	$3 \times 10^4$ [ $10^2$ ]	$10^6$ [ $10^2$ ]
	77	$2 \times 10^6$	$6 \times 10^4$ [ $10^2$ ]	n.d.
L. lactis subsp. cremoris 145G	145	$2 \times 10^7$	$2 \times 10^6$ [ $10$ ]	$4 \times 10^6$ [ $10$ ]
L. lactis subsp. cremoris 737	20	$2 \times 10^7$	$5 \times 10^5$ [ $10^2$ ]	$5 \times 10^5$ [ $10^2$ ]
	28	$4 \times 10^6$	$3 \times 10^3$ [ $10^3$ ]	$7 \times 10^3$ [ $10^3$ ]
Lactobacillus helveticus 892	832-B1	$4 \times 10^6$	$2 \times 10^4$ [ $10^2$ ]	n.d.

a = les chiffres correspondent au nombre de phages par ml (ufp)

b = les chiffres entre parenthèses indiquent la chute de ufp en

présence de Deadpack

c = utilisé à l'INRA pour la production de fromage

n.d. = non-déterminé

TABLEAU 1

2701715

10

**EXEMPLE 3 : DEADPACK DIMINUE LE TITRE DE PHAGES ET PERMET LA  
SURVIE DE BACTERIES VIVANTES**

La capacité de Deadpack-UV de diminuer le titre des phages  
et permettre la croissance de cellules vivantes est testée. Trois souches et  
6 phages différents sont utilisés. Pour chaque paire, (la souche et le phage  
spécifique de la souche),  $5 \cdot 10^8$  cellules mortes sont mélangées avec entre  
 $10^4$  et  $10^8$  phages par millilitre (ml), dans un milieu du laboratoire (comme  
indiqué précédemment). Le témoin ne contient pas de cellules mortes.  
Après 180 minutes d'incubation à  $30^\circ \text{C}$ , des cellules vivantes sont ajoutées  
à raison de  $2 \cdot 10^7$  par ml. L'incubation continue encore 100 minutes.  
Pendant toute cette période, les titres des phages dans les cultures avec et  
sans Deadpack sont déterminés. La figure 1 (a-f) représente les courbes de  
titrage des phages dans des cultures traitées (symboles pleins) ou non  
(symboles vides) par les cellules mortes. Dans chaque cas, le développement  
des phages est inhibé par la présence de cellules mortes, avec une  
diminution de phages entre  $10^2$  et  $10^5$  fois. L'effet de l'addition de  
Deadpack sur la croissance des bactéries est également étudié (Figure 1g).  
En présence des cellules mortes (symboles pleins), les cellules poussent  
normalement comme les cellules sans phage et sans cellules mortes  
(symbole x) mais en leur absence et en absence de phage (symboles vides),  
la survie est seulement de  $1/10^5$ .

Ces résultats démontrent l'efficacité de l'invention : l'addition  
de Deadpack aux cultures provoque une diminution du titre en phage et  
permet la croissance des cellules vivantes.

Les cellules mortes traitées par la chaleur sont aussi utilisées  
dans l'exemple 3, pour voir si elles ont le même effet. Bien que les cellules  
inactivées, soit par les UV, soit par la chaleur, donnent également de bons  
résultats dans les tests de titrage statiques, les cellules traitées par les UV  
sont plus efficaces pour protéger la croissance des cellules que les cellules  
traitées par chauffage. Ces résultats peuvent indiquer que les récepteurs de  
cellules traitées par la chaleur sont plus rapidement dégradés. D'autre part,  
le Deadpack aux UV, qui est résistant aux phages, peut fermenter le lait et  
aider à la baisse de pH du milieu.

2701715

11

Les cellules d'une des souches testées, 145G, ayant survécu à l'infection phagique lors de l'expérience de préincubation avec des Deadpack UV, sont testées pour leur sensibilité aux phages. Les survivants sont étalés en culture et montrent la même sensibilité aux phages que la souche d'origine, indiquant que le traitement par les UV n'a pas sélectionné des mutants résistants aux phages.

#### EXEMPLE 4 : LE DEADPACK UV NE PERMET PAS LE DEVELOPPEMENT DE PHAGES

10

Un milieu de culture M17 supplémenté par  $\text{Ca}^{++}$  0,1M contenant Deadpack UV à une concentration de  $10^9$  cellules par ml, et un milieu de culture identique mais contenant des cellules vivantes de la souche L. lactis 145 à une concentration de  $10^9$  cellules par ml, sont infectés respectivement par le phage 145 à  $10^9$  ufp/ml, et incubés à 30°C. Des échantillons de milieu de culture sont prélevés juste avant l'addition des phages et aux temps 10, 20 et 40 min après l'addition des phages. Une partie est utilisée pour titrer le surnageant (cf. exemple 2 pour protocole) et l'autre partie est utilisée pour analyser le développement des phages dans les cellules. Les cellules sont séparées du surnageant par centrifugation, traitées par du lysozyme et lysées par addition d'un détergent. On fait migrer les lysats cellulaires et les surnageants sur un gel d'agarose qui est ensuite photographié puis transféré sur une membrane de nitrocellulose. Une sonde spécifique du phage est utilisée pour révéler la présence du phage sur les échantillons chargés sur le gel. Les résultats sont présentés dans la figure 2.

Dans la figure 2A, la photo des lysats cellulaires (cellules vivantes "LIVE", ou les Deadpack UV "DEADPACK") préparés au temps "TIME" indiqué après infection par les phages. Dans cette partie, on voit l'état de l'ADN cellulaire. Dans la figure 2B, les mêmes échantillons sont déposés dans le même ordre, mais ici seulement le phage présent dans le lysat est détecté (révélé par une sonde spécifique qui s'attache aux phages).

2701715

12

Quand les cellules vivantes "LIVE" sont attaquées, la quantité de phages est fortement augmentée; avec une croissance marquée dans les 20 premières minutes après l'infection. Par contre, le Deadpack UV "DEADPACK" infecté par les phages ne permet pas la multiplication des phages, même après 360 minutes d'incubation. Le titre en phage dans les surnageants est indiqué dans le tableau ci-dessous. Comme observé précédemment, le titre en phages est diminué en présence de Deadpack UV après incubation avec les phages.

10

## TITRE EN PHAGE DANS LES SURNAGEANTS (ufp)

	Temps (min)	0	10	20	40	120
	Cellules vivantes	$6 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$8 \times 10^8$	-
15	Deadpack	$4 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$4 \times 10^6$	$4 \times 10^6$	$2 \times 10^6$

Ces résultats montrent directement que le Deadpack UV ne permet pas la multiplication des phages.

20

EXEMPLE 5 : EFFET DE DEADPACK UV SUR LA SURVIE DES BACTERIES  
EN PRESENCE DE PHAGES DANS LE LAIT

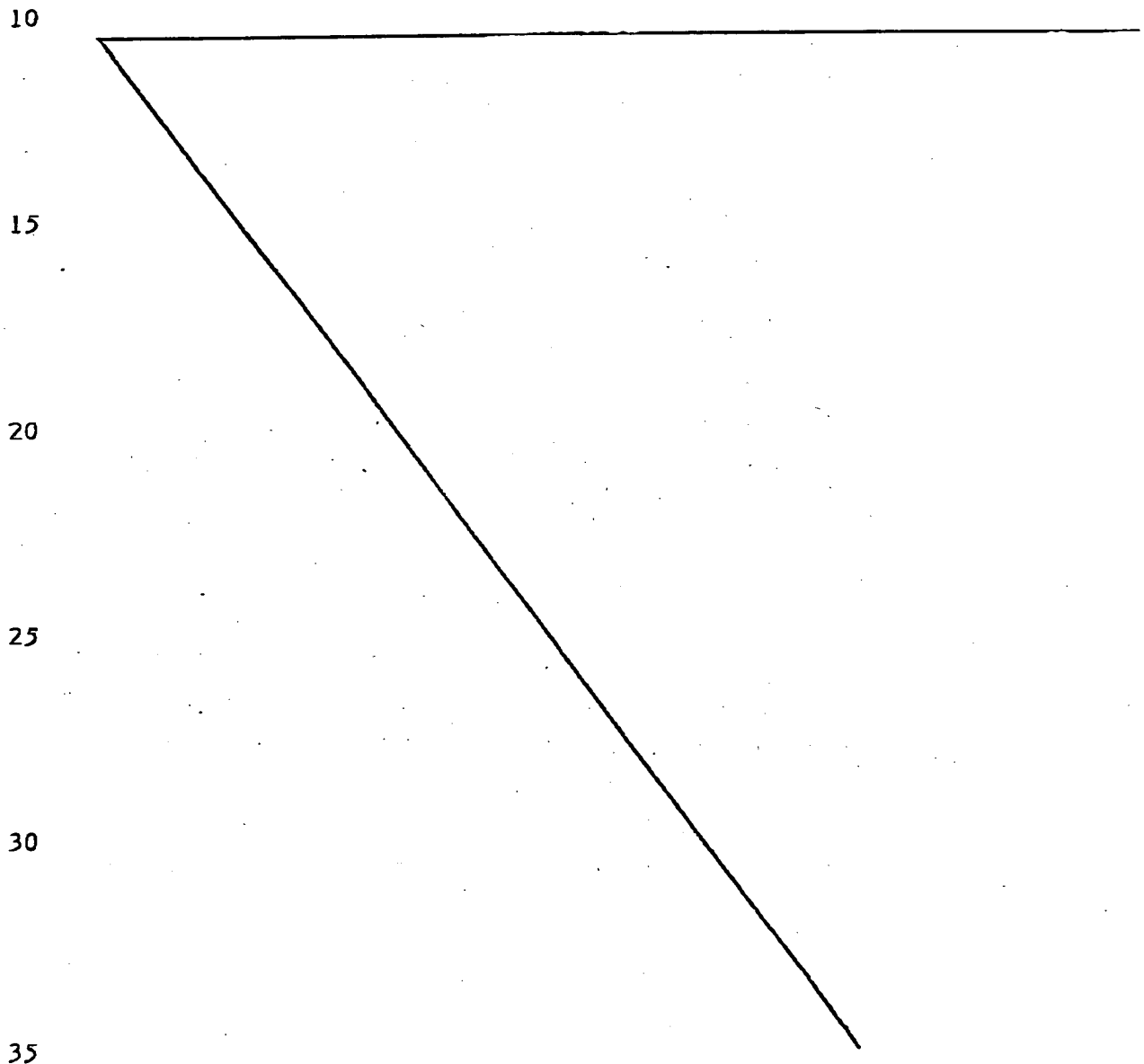
Des concentrations différentes de phage 145 ( $0$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  ou  $10^7$  ufp/ml) sont distribuées en deux séries dans des tubes contenant 2 ml de lait pasteurisé. Deadpack UV ( $5 \cdot 10^8$  cellules par ml) est rajouté dans une série, mais pas dans l'autre. Après 2 heures d'incubation à  $30^\circ\text{C}$ , des cellules vivantes sont ajoutées à une concentration de  $2 \cdot 10^7$  cellules par ml dans chaque tube, et laissées à incuber pendant une nuit. Le lait contient un colorant, le litmus, dont la couleur varie avec le pH : en absence de croissance cellulaire, le pH reste neutre et l'indicateur confère au lait une coloration violette ; lors de la croissance des cellules, il y a

35

2701715

13

acidification du milieu et l'indicateur devient blanc. En absence de Deadpack (rangée inférieure) la croissance des cellules est bloquée par la présence des phages et le milieu demeure liquide et violet. Dans les échantillons contenant Deadpack (rangée supérieure) les cellules se multiplient en présence de phages (jusqu'à  $10^6$  ufp/ml ajouté) et le lait est coagulé et blanc (voir figure 3).





2701715

14

### REVENDECATIONS

5 1. Procédé de décontamination d'un milieu de fermentation caractérisé en ce que, avant, ou pendant, l'introduction de l'inoculum de fermentation, le milieu est mis en contact intime avec des éléments solides comportant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries de l'inoculum, pendant un temps suffisant pour assurer la fixation des contaminants, en particulier des phages.

10 2. Procédé de décontamination selon la revendication 1, caractérisé en ce que les éléments solides sont choisis dans le groupe comprenant :

- les bactéries de l'inoculum mortes,
- des préparations d'enveloppes obtenues à partir de bactéries de l'inoculum, mortes, désintégrées.

15 3. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que les éléments solides sont mis en suspension dans le milieu de fermentation.

20 4. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les éléments solides sont immobilisés sur un support solide.

5. Procédé de décontamination selon la revendication 4, caractérisé en ce que les éléments solides sont immobilisés sur un support particulière ou sur une membrane.

25 6. Procédé de décontamination selon la revendication 5, caractérisé en ce que les éléments solides sont immobilisés sur une membrane, à travers laquelle on fait passer le milieu de fermentation.

7. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les éléments solides sont écartés avant addition de l'inoculum de fermentation.

30 8. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'après un cycle de fermentation :

2701715

15

- a) on introduit dans la cuve de fermentation un milieu contenant des éléments solides comportant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries de l'inoculum,
- b) après un temps de contact suffisant, on élimine le milieu contenant lesdits éléments solides,
- c) on introduit dans la cuve du milieu de fermentation frais, éventuellement traité par le procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on introduit un inoculum de fermentation,
- d) on réalise une nouvelle fermentation.
9. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisé en ce que les bactéries mortes sont obtenues à partir d'une culture de bactéries en phase stationnaire, soumise à un traitement par les UV, par les rayons X, gamma, ou par la chaleur.
10. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisé en ce que les éléments solides sont obtenus à partir d'une culture de bactéries en phase stationnaire, soumises à une désintégration par un traitement mécanique, puis séparation et récupération des débris cellulaires.
11. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les bactéries mortes sont ajoutées au milieu de fermentation à une concentration finale comprise entre  $10^6$  et  $10^9$  bactéries mortes par ml.
12. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre dans le cadre d'un procédé de fabrication de produits lactés par fermentation menée par des bactéries lactiques.
13. Procédé de décontamination selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que les bactéries mortes font une partie de la fermentation.
14. Produit permettant la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments solides comportant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries participant à la fermentation.

2701715

16

15. Produit permettant la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comporte un support sur lequel sont adsorbés des éléments solides comportant les récepteurs normalement présents sur les enveloppes des bactéries participant à la fermentation.

10

15

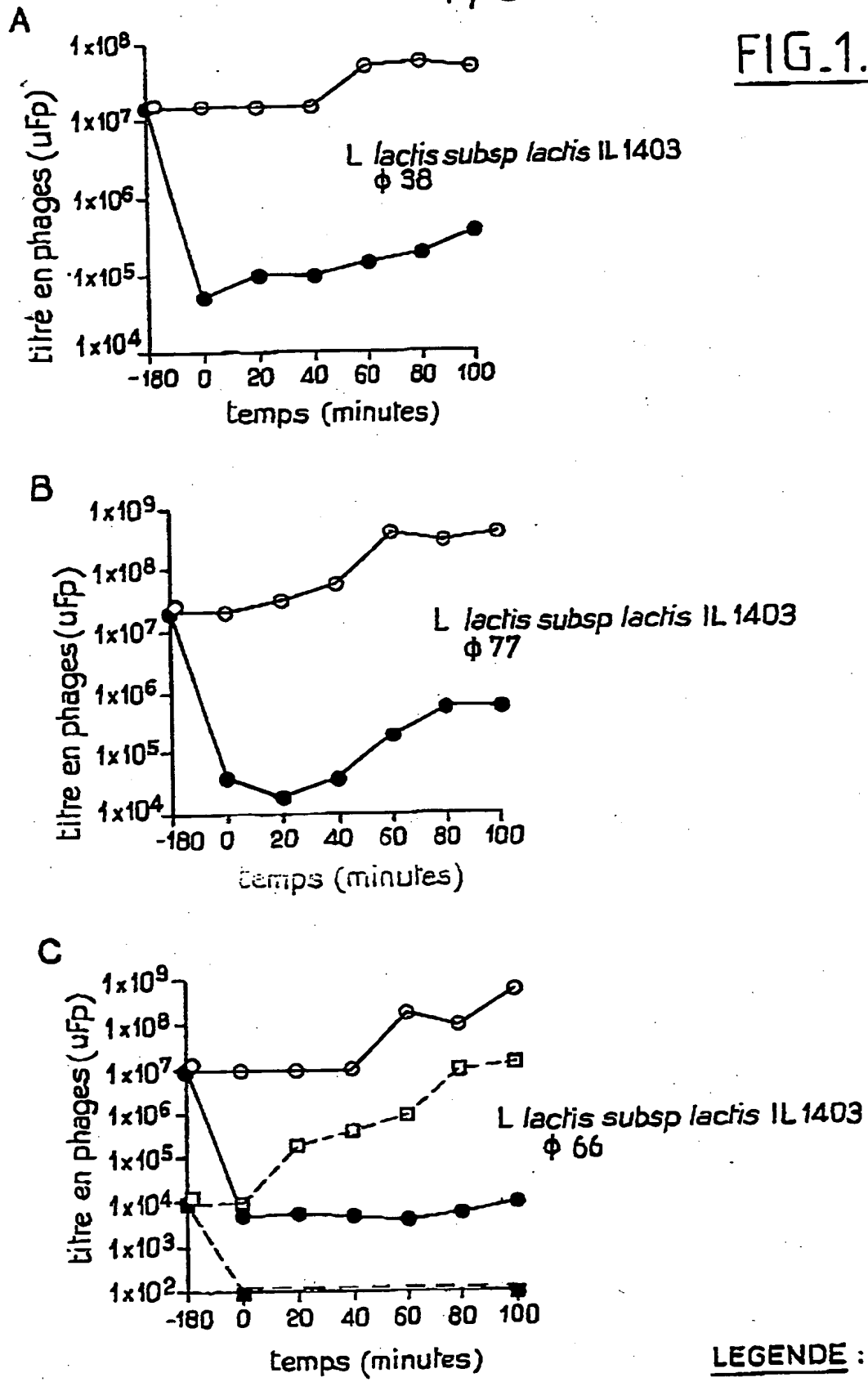
20

25

30

2701715

1 / 5

FIG.1.1LEGENDE :

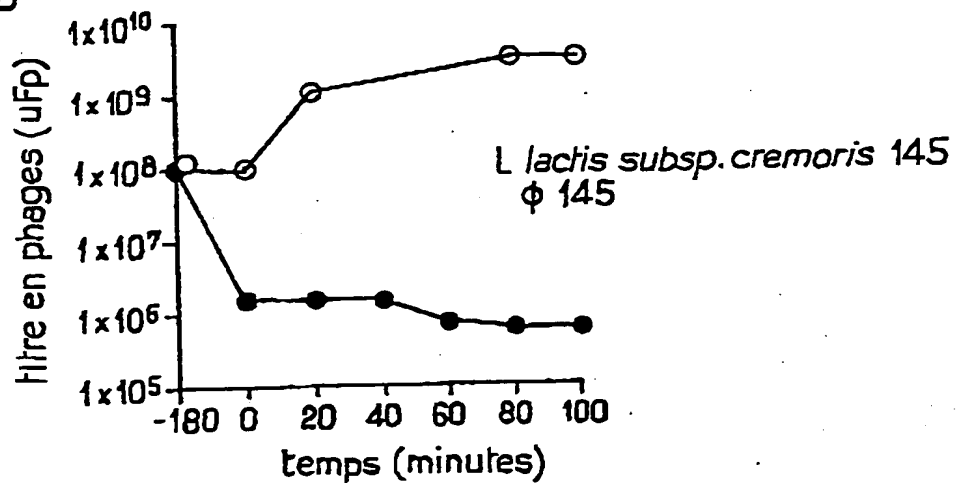
- □ sans Deadpack plus phage  
● ■ plus Deadpack plus phage

2701715

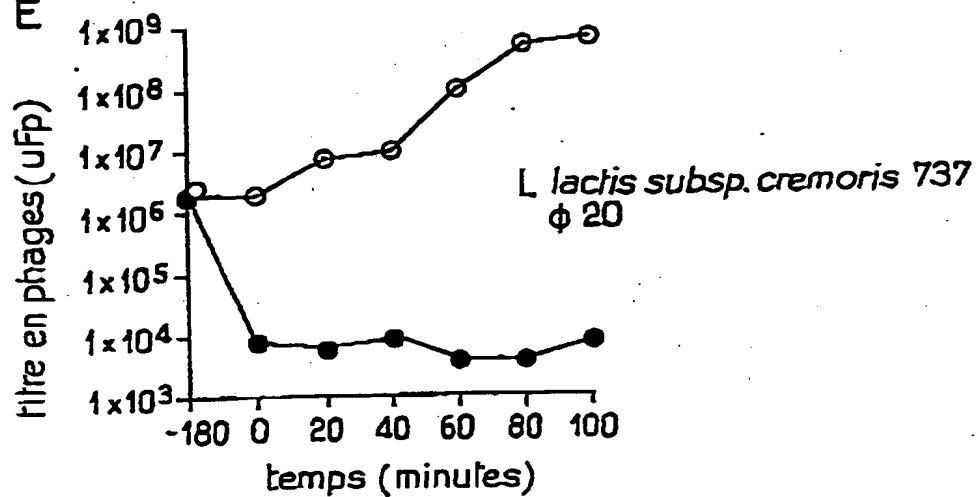
2 / 5

FIG.1.2

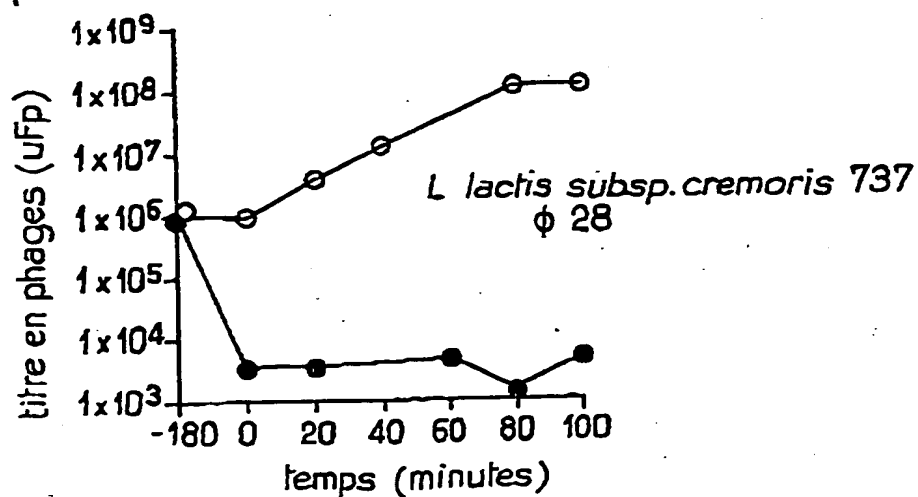
D



E

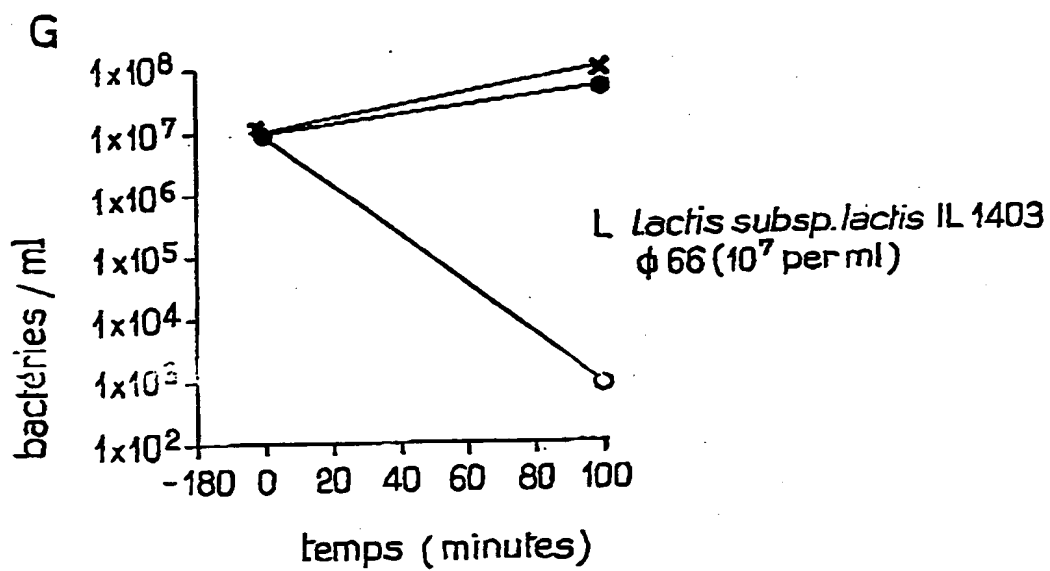


F



2701715

3 / 5

FIG.1.3

2701715

4 / 5

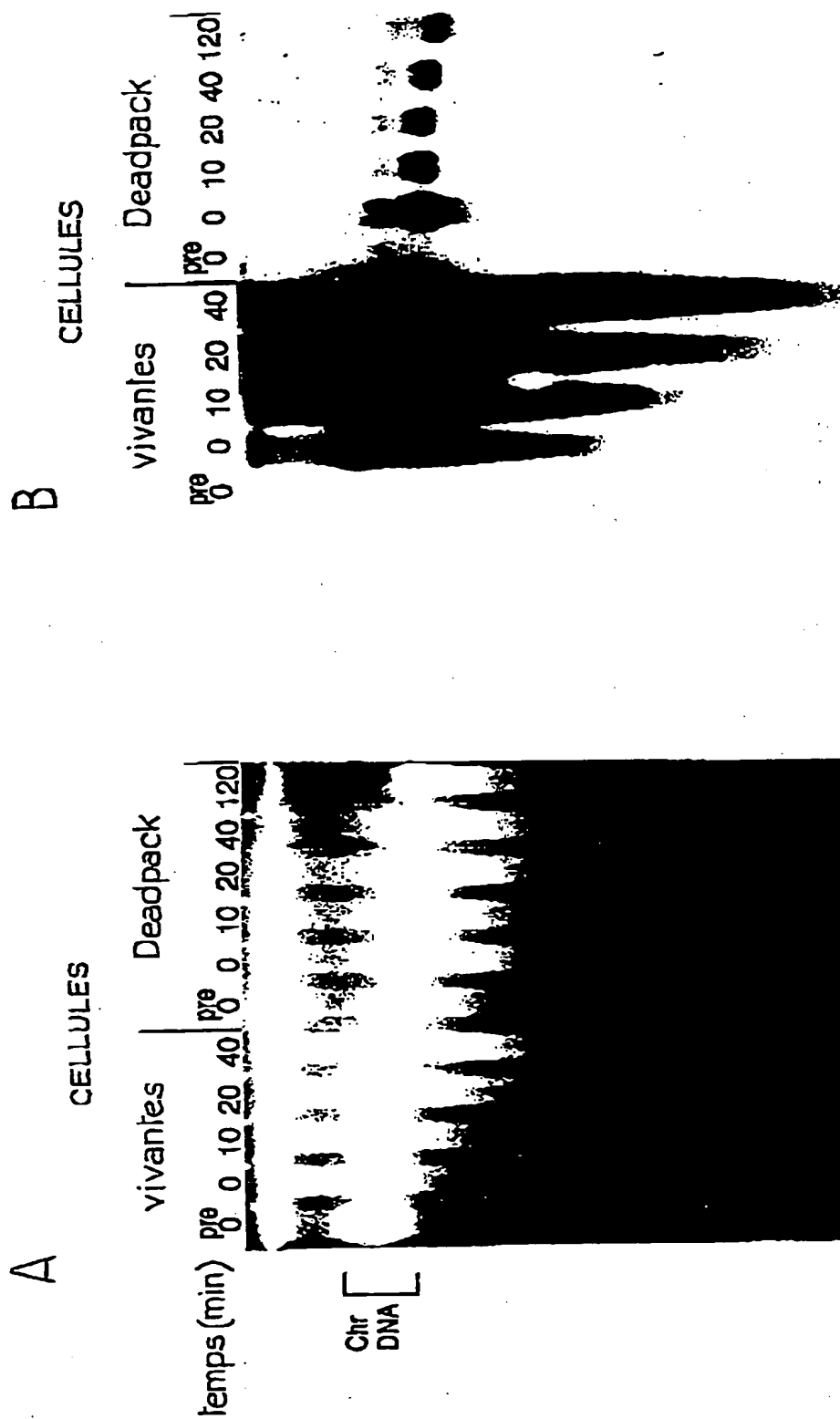


FIG. 2

2701715

5/5

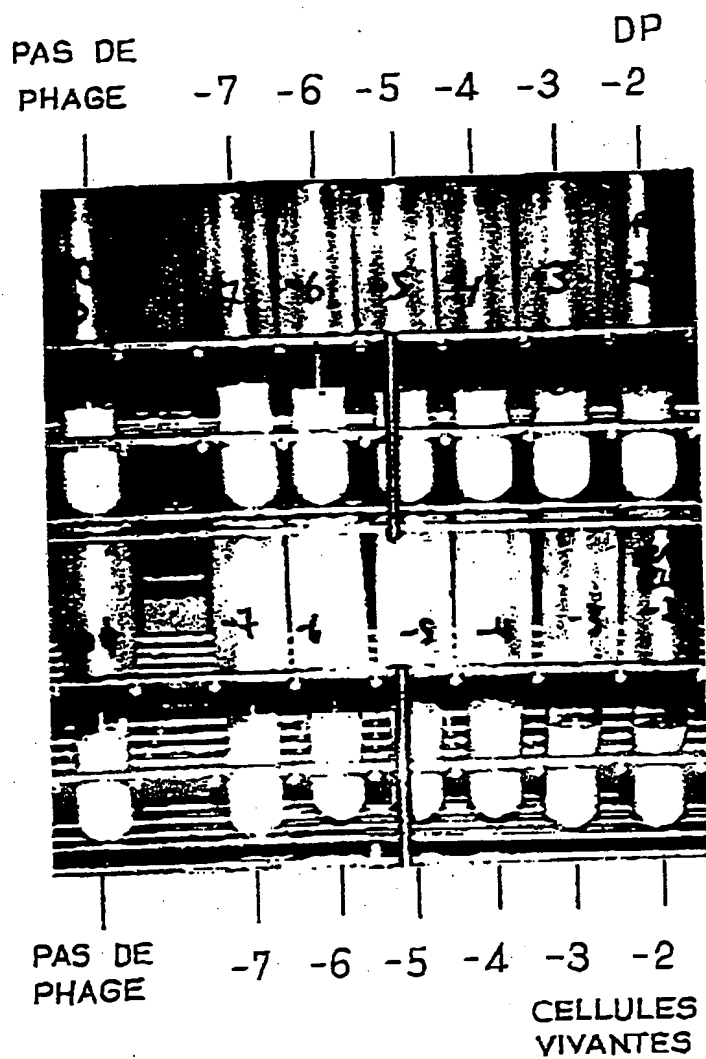


FIG. 3



REPUBLIQUE FRANÇAISE

2701715

N° d'enregistrement  
national

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

de la

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

PROPRIETE INDUSTRIELLE

FR 9301776  
FA 481451

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-8 404 696 (BAXTER TRAVENOL LABORATORIES) * le document en entier *	1, 3-6, 14, 15
A	GB-A-2 159 537 (TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION LTD) * le document en entier *	1, 2
A	DATABASE WPI Week 8026, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 80-45981C & SU-A-697 122 (PLANTS MICROBIOL.) 20 Novembre 1979 * abrégé *	1, 2, 7-9
A	EP-A-0 149 383 (L'AIR LIQUIDE) * le document en entier *	1, 12, 14
A	WO-A-8 602 091 (IMMUNOTECH) * le document en entier *	1, 3-6
A	DATABASE WPI Week 8450, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 84-307377 & DD-A-212 531 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) * abrégé *	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (int. CL.5)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche 02 NOVEMBRE 1993		Examinateur DE KOK A.J.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un  autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication  ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document interactif</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure  à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date  de dépôt ou qu'à une date postérieure  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**